

Aus der Universitäts-Frauenklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Direktor: Professor Dr. Thomsen

Zur Frage der Prognose
des Mamma-Carcinoms aus den Reaktionen
der regionären Lymphknoten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

MARIA ELISABETH EGERNBURG
aus Breslau

Mainz 1963

Aus der Universitäts-Frauenklinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Direktor: Professor Dr. Thomsen

Zur Frage der Prognose des Mamma-Carcinoms
aus den Reaktionen der regionären
Lymphknoten.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen
Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Maria Elisabeth Egerburg
aus Breslau

Mainz 1963



Dekan : Professor Dr. Thomsen

Referent: Professor Dr. Thomsen

Inhaltsübersicht

Einleitung und Fragestellung

Material

Methoden

Untersuchungsergebnisse und deren Diskussion

I. Histologische Untersuchung der Lymphknoten nach
Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Bindegewebsdarstellung

- A. Die überwiegende oder alleinige lymphatische Reaktion
- B. Reaktion der Sinusretothelien

II. Histochemische Reaktionen in Lymphknoten und
Primärtumor

- A. Morphologie und histochemischer Charakter der Kohlenhydrate in den Reticulumzellen
- B. Histochemischer Charakter der Kohlenhydrate im Primärtumor
- C. Zur Frage der Entstehung der kohlenhydrathaltigen Einschlüsse in den Reticulumzellen der Lymphknoten

III. Bestehen Beziehungen zwischen Sinusretothelkohlenhydraten und anatomischer Lymphknotenreaktion und lassen diese Schlüsse auf die Tumorprognose zu?

IV. Das Auftreten von Mastzellen im Lymphknoten in Beziehung zu Überlebensdauer und Metastasierung

Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Zur Frage der Prognose des Mamma-Carcinoms aus den

Reaktionen der regionären Lymphknoten

Bei der Ausbreitung maligner Tumoren auf dem Blut- und Lymphweg ist der Versuch verständlich, die Auseinandersetzung zwischen Tumor und Wirtsorganismus über das lokale Geschehen hinaus, aus den Veränderungen der regionären Lymphknoten prognostisch zu beurteilen. Eine Reihe hierzu veröffentlichter Untersuchungen zeigt, daß eine Reaktion des reticulo-histiocytären Systems im Lymphknoten prognostisch als günstiger angesehen werden muß als ihr Fehlen (WUKETICH; WARTMANN; BLACK, KERPE und SPEER; BLACK, OPLER und SPEER; BLACK, SPEER und OPLER; BAUMECKER u.a.) LEIDENIUS hält die Abwehrfunktion der Lymphknoten sogar für so bedeutsam, daß er ihre radikale Ausräumung bei der Operation als eine das Heilungsergebnis eventuell beeinträchtigende Maßnahme ansieht.

Bekannt wurden bislang fast ausschließlich rein morphologische Untersuchungen der Lymphknoten im Tumorabflußgebiet. Sie lassen eine Reaktion des lymphatischen Anteils von derjenigen der Mesenchymzellen des Reticulums und Mischformen beider unterscheiden. Dabei wird die Wucherung der Reticulumzellen meist mit immunbiologischen Vorgängen in Verbindung gebracht. Das darf bei ihren bekannten Phagocytoseeigenschaften und der immunbiologischen Bedeutung der (zumindest in einer Form) vom Reticulum abstammenden Plasmazellen nicht verwundern.

Aus einer dieser Eigenschaften ließe sich auch das Auftreten von Kohlenhydraten in den Retothelzellen der Lymphknoten von (nichtcarcinomatösen) Mäusen und Schweinen deuten, das TEILUM 1955 nach Injektionen von Caseinlösungen mit der PAS-Reaktion (McMANUS und HOTCHKISS) beobachtete. Diese Kohlenhydrate spricht er

als Amyloid an und sieht in ihnen ein immunhistologisches Äquivalent. JUSTIN-BESANÇON u. Mitarb. beschrieben in demselben Jahr Ablagerungen von PAS-positiven kugeligen Gebilden in den Lymphknoten bei chronischer Polyarthrit, die sie für "depolymerisierte saure Mucopolysaccharide" hielten. LENNERT neigt zu der Auffassung, ihr Auftreten in den Sinusendothelien als Hinweis auf eine chronische Polyarthrit anzusehen. Nun konnte STRAUSS 1956 erstmals derartige kohlenhydrathaltige Kugeln auch in den regionären Lymphknoten von Collum-Carcinomen darstellen. Daraus ergaben sich unter Berücksichtigung der bisherigen Beobachtungen und deren unterschiedlicher histochemischer und causal-genetischer Deutung die Fragen, ob es sich hierbei um Ablagerung von Kohlenhydraten aus dem Tumorparenchym oder seinem Stroma oder aber um zelleigene Bildungen des Sinusretothels handele.

Zuvor war es notwendig nachzuweisen, daß sie nicht die Folge einer Superinfektion des Tumorgewebes sind, wie sie beim Collum-Carcinom bereits ohne vorausgegangene Probeexcision vorkommen kann. Diese in den bisherigen Betrachtungen der Lymphknotenreaktionen bei Carcinomen durch andere Autoren nur selten beachtete mögliche Fehlerquelle, läßt sich durch Schnellschnittdiagnose und sofort folgende Radikalooperation am ehesten beim Mamma-Carcinom vermeiden.

Danach galt es, den histochemischen Charakter der beobachteten Kohlenhydrate zu untersuchen und mit denen des Tumorparenchyms und seines Stromas zu vergleichen. Darüber hinaus war zur Frage ihrer evtl. biologischen Bedeutung für die Abwehrreaktion der Lymphknoten und damit - unter Vorbehalt - auch der Tumorprognose, ihr Verhalten am Auftreten anderer Lymphknotenreaktionen und deren Beziehungen zur Überlebensdauer und Metastasenhäufigkeit zu prüfen.

M a t e r i a l

Untersucht wurden die regionären Lymphknoten aus der Axilla von 52 Patientinnen, die in der Universitäts-Frauenklinik Mainz wegen Mamma-Carcinoms radikal operiert worden waren. Die Auswahl beschränkte sich zur Vermeidung unspezifischer entzündlicher Reaktionen nur auf Fälle, bei denen der Schnellschnittdiagnose des Primärtumors die Radikaloperation sofort angeschlossen worden war. Für die Herstellung des Schnellschnittpräparates werden etwa 10 Minuten benötigt, sodaß der zeitliche Abstand von der Probeexcision bis zum eigentlichen Operationsbeginn im Durchschnitt etwa 15 Minuten beträgt und für das Eintreten von Lymphknotenreaktionen zu gering ist.

In allen Fällen fehlten klinisch Metastasen in den Supraclaviculargruben oder Fernmetastasen im Skelettsystem. Eine Vorbehandlung durch Bestrahlung oder Cytostatica hatte in keinem der Fälle stattgefunden.

Über die Verteilung der Primärtumoren nach Lebensalter und Tumorsitz unter Berücksichtigung von Metastasen unterrichtet Tabelle 1:

Tabelle 1

Alter	Sitz des Tumors									
	OÄQ	M	OIQ	M	UÄQ	M	UIQ	M	zentral	M
30-40	2	1	1	0					3	3
40-50	4	3	2	2	1	0			8	5
50-60	8	4	3	1	1	1			5	4
60-70	4	1							8	6
70-80					1	1			1	0
Sa.:	18	9	6	3	3	2			25	18

Insgesamt: 52 Fälle, dabei 32 Metastasen

OÄQ = oberer äußerer Quadrant
 OIQ = oberer innerer Quadrant
 UÄQ = unterer äußerer Quadrant
 UIQ = unterer innerer Quadrant
 M = Metastase

M e t h o d e n

=====

I. Fixierung des Materials

Sofort nach der Operation wurden die radikaloperierte Mamma und das axilläre Fettgewebe in 10%-iges Formalin eingebracht und etwa eine Woche lang fixiert. Dann haben wir aus mehreren Stellen des Primärtumors Gewebe zur histologischen Untersuchung entnommen, um das Verhalten des Tumors selbst und die Reaktionen seines Stromas beurteilen zu können. Die Lymphknoten lassen sich im axillären Fettgewebe am besten dadurch erfassen, daß man dieses in Abständen von 3-4 mm lamelliert und die erhaltenen Scheiben durchtastet. Sie wurden in Längs- oder Querrichtung halbiert oder- falls zu klein- in toto eingebettet.

II. Weiterverarbeitung des Materials

Der Einbettung in Paraffin über Alkohol und Toluol folgte die Herstellung von 5-6 μ dicken Schnitten auf dem Mikrotom (Jung), die in handwarmem Wasser gestreckt und auf den Objektträger gebracht wurden, der mit koagulierte[m]m Serunglycerin vorbereitet war.

Nur für die Durchführung der Reaktionen auf Lipide wurden Gefrierschnitte hergestellt. Da diese wegen ihrer erheblichen Dicke meist außerordentlich schwer zu beurteilen sind, haben wir zusätzlich auch im Kryostaten (System Dittes-Duspiva) angefertigte Nativschnitte zu diesen Untersuchungen mit herangezogen.

III. Histologische Färbungen und histochemische Reaktionen

Außer der üblichen Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-Färbung und der Bindegewebsdarstellung nach von Gieson, wurden folgende histologische Färbungen und histochemische Reaktionen, deren methodische Einzelheiten bei der Darstellung der Ergebnisse wiedergegeben werden, durchgeführt:

1. Perjodssäure-Leukofuchsin (PAS)-Reaktion (McMANUS und HOTCHKISS) nach den Angaben von PEARSE. Herstellung des Schiffschen Reagenz mit Pararosanilin in der Modifikation von GRAUMAN.

2. PAS-Reaktion nach enzymatischer Glykogenolyse durch Diastase (LILLIE und GRECO) oder Speichelverdauung (die nach LIPP selektiver sein soll).

3. Reversible Acetylierung nach McMANUS und CASON zur Unterscheidung von PAS-positiven Glykolen, α -Aminoalkoholen und Äthylenverbindungen.

4. Glykogennachweis mit der Kaliumkarmin-Methode nach BEST (Romeis § 1102f); Kontrolle der Ergebnisse durch Diastaseverdauung.

5. Glykogendarstellung mit der Chromsäureoxydationstechnik von BAUER (Romeis § 1104).

6. Färbung mit Alcianblau (STEEDMAN) zum Nachweis mesenchymaler und epithelialer saurer Mucopolysaccharide
a. in 2%-iger wässriger Lösung für 8-10 Sekunden (PEARSE)
b. in 3%-iger Essigsäure für 15 Minuten (LISON).

7. Prüfung der Metachromasie mit Toluidinblau (0,1%-ige alkoholische Lösung) nach KRAMER und WINDRUM, wobei nach dem Vorschlag dieser Autoren nur die alkoholfeste Metachromasie als echte Metachromasie angesehen wird.

8. Aldehydfuchsin-Färbung nach GOMORI zum Nachweis von Sulfo-Gruppen (Bespprechung der Differenzierung dieser Färbung im Text).

9. Prüfung der Methyleneblau-Bindung des Gewebes bei abgestuftem pH (Basophilie) nach FISCHINGER entsprechend den Angaben von PEARSE. Wegen der starken Methyleneblau-Bindung

der Nucleinsäuren wurde die Methylenblau-Bindung des Gewebes vor und nach Nucleinsäurenhydrolyse untersucht.

10. Darstellung der Fettsubstanzen mit Sudan-Schwarz (Ceres-Schwarz) nach den Angaben von PEARSE.

11. Perameisensäure-Schiff (Pfas-)-Reaktion zur Darstellung von Äthylenverbindungen sowie Disulfid- und Sulfhydryl-Gruppen (PEARSE 1952, LILLIE 1952).

12. PAS-Reaktion nach 12-stündiger Chloroform-Methylalkohol-Vorbehandlung bei 65°C zur Entfernung der Lipide.

13. Prüfung der Doppelbrechung (Anisotropie).

14. Darstellung der Desoxyribonucleinsäuren durch die Feulgen-Reaktion (Romeis § 1233).

15. Gleichzeitige Darstellung von Ribonucleinsäuren (RNS) und Desoxyribonucleinsäuren (DNS) durch die Gallocyanin-Chromalaun- bzw. Methylgrün-Pyronin-Färbung .

16. Gekuppelte Tetrazonium-Reaktion als Gruppennachweis von Eiweißen (LISON, DANIELLI) vor und nach Benzoylierung in der Vorschrift nach PEARSE.

17. Amyloidnachweis mit Kongorot (Romeis § 1205).

18. Berliner-Blau-Reaktion auf Eisen (Romeis § 1205)

In allen 52 Fällen wurden an den Präparaten des Primärtumors und der Lymphknoten die HE-, van Gieson-Färbung, PAS-, Diastase-PAS-Reaktion und die Toluidinblau-Färbung durchgeführt.

Für die spezielle histochemische Analyse der in Frage stehenden Kohlenhydrate haben wir 3 Fälle ausgewählt, von denen einer keine Carcinomeinbrüche in den Lymphknoten zeigte.

Soweit fermentative Untersuchungen mit Hyaluronidase durchgeführt wurden, sind diese besonders angegeben.

U n t e r s u c h u n g s e r g e b n i s s e u n d d e r e n D i s k u s s i o n

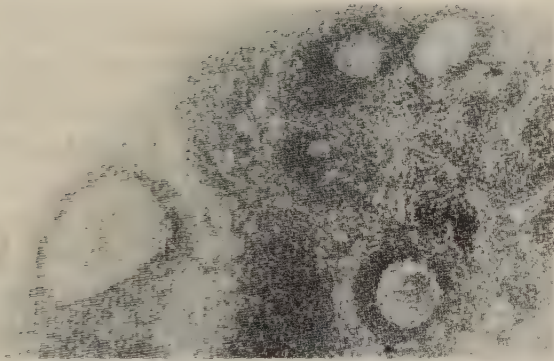
I. Histologische Untersuchung der Lymphknoten nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Bindegewebstdarstellung

(van Gieson)

Die axillären Lymphknoten lassen bei Hämatoxylin-Eosin-Färbung zwei verschiedene histologische Reaktionsformen, entweder die isolierte Hyperplasie der Lymphfollikel oder die der Sinusretothelien (SR) erkennen. In einem Teil der Fälle zeigen sich auch Mischformen zwischen beiden.

A. Die überwiegende oder alleinige lymphatische Reaktion

ist leicht an rundlichen, scheinbaren Aufhellungen innerhalb der Lymphocytenansammlungen erkennbar; dabei sind die Sinus nicht entfaltet (Abb. 1).



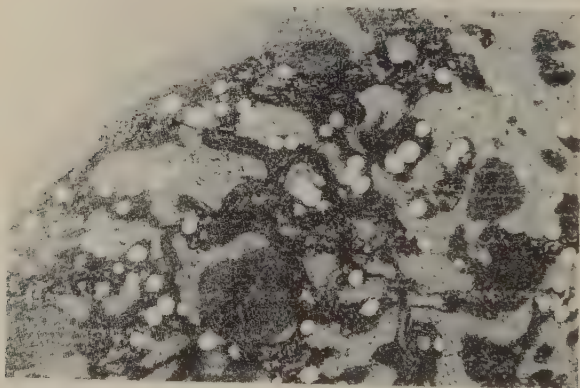
Die Aufhellungen entsprechen hellen Bezirken in den Sekundärknötchen (Sekundärfollikeln), die von FLEMMING als Keimzentren, von HELLMANN als Reaktionszentren bezeichnet wurden. In Übereinstimmung mit LENNERT geben wir dem Begriff des Keimzentrums den Vorzug. Diese Form der lymphatischen Reaktion wird als "follikuläre" im Gegensatz zur diffusen lymphatischen Hyperplasie bezeichnet. Es scheint, als drängten die zahlreichen vergrößerten Keimzentren das lymphatische Gewebe zirkulär auseinander.

Ihre geringere, als Aufhellung erscheinende, Anfärbbarkeit kommt vorwiegend durch große Reticulumzellen mit schwach eosinophilem Cytoplasma und bläschenförmigen Kernen zustande. Zahlreiche Mitosen zeigen die lebhafteste Zellneubildung. Daneben finden sich typische basophile Zellformen, die als Germinoblasten (LENNERT) bezeichnet werden. Schließlich wird die relativ eintönige Anordnung der Lymphocyten von Aufhellungen durchbrochen, die durch einzelne Zellen (wohl Germinoblasten und Reticulumzellen) verursacht sind

und von LENNERT als Sternhimmelzellen bezeichnet werden.

B. Reaktion der Sinusretothelien (SR)

Die unregelmäßige Aufzweigung der Lymphsinus läßt sich erst nach ihrer Erweiterung durch die gewucherten Sinusretothelien deutlich erkennen (Abb. 2).



Die Retothelzellen zeigen ein großes Cytoplasma und hängen häufig mit Plasmafortsätzen untereinander zusammen. Ihre Kerne sind teils rundlich, teils länglich epitheloid mit feinem Chromatingerüst. Daneben finden sich gelegentlich Plasmazellen, erkennbar an ihren exzentrischen, radspeichenartigen Kernen und dem reichlichen Cytoplasma, ferner Mastzellen, die jedoch erst durch Toluidinblau-Färbung infolge der Metachromasie ihrer Heparin granula sicher abgrenzbar werden und schließlich - allerdings selten - auch polymorph'kernige Leukozyten.

BLACK und SPEER sprechen in diesen Fällen von einem Sinuskatarrh und verstehen darunter eine hohe Zellzahl an (teilweise vakuolisierten) Retothelien, Lymphocyten, Plasma-

zellen und Erythrocyten in den Sinus. Mit dieser Definition stimmen unsere eigenen Beobachtungen meist nicht überein. Sie entsprechen eher dem von diesen Autoren herausgestellten Bild der sinoidalen Phagocytose, die durch abgerundete Retothelien mit scharfer Plasmagrenze gekennzeichnet ist, oder dem der syncytialen Histiocytose, bei der die Proliferation von länglichen, syncytial angeordneten Retothelien mit unscharfer Plasmagrenze im Vordergrund steht. LENNERT hat diese Form als "chronischen Sinuskatarrh" bezeichnet.

Dieser soll- ebenfalls nach LENNERT- in den axillären und inguinalen Lymphknoten fast als physiologisch anzusehen sein. BLACK und SPEER fanden ihn am häufigsten in den regionären Lymphknoten von Carcinomen, besonders beim Mamma-Carcinom. Eine Reihe von Autoren wertet ihn- trotz der Einwände von BERG- als prognostisch günstiges Zeichen. LENNERT hält es aber für fraglich, ob die Proliferation der SR selbst die Ursache des günstigeren Krankheitsverlaufes ist, oder ob nicht etwa die oft damit verknüpfte Mastocytose dem Tumorstadium entgegenwirkt. Die meisten morphologischen Feststellungen basieren aber auf der Untersuchung von Lymphknoten, in deren Quellgebiet unspezifische Entzündungsherde, meist nach vorausgegangener Probeexcision, vorlagen. Diese beeinflussen die Reaktion der Lymphknoten erheblich und können zu Fehldeutungen Anlaß geben. Daher mußte die Untersuchung von Lymphknoten, bei denen die einzeitige Operation mit Schnellschnittdiagnose Sekundärreaktionen vermied, für diese Fragen von besonderem Interesse sein.

Unter diesen Bedingungen fanden wir die Wucherungen der SR weit häufiger (37%) als die reine follikuläre lymphatische Hyperplasie (ca. 5%) oder die Mischform beider (ca. 31%). Der Rest der untersuchten 52 Fälle (ca. 27-28%) zeigte keinerlei Reaktion der Lymphknoten.

Die morphologischen Reaktionen der Lymphknoten waren nun mit den histochemischen unter der Zielsetzung einer Betrachtung ihrer Verwertbarkeit für eventuelle prognostische Schlüsse hinsichtlich der Carcinomheilung zu vergleichen.

II. Histochemische Reaktionen in Lymphknoten und

Primärtumor

A. Morphologie und histochemischer Charakter der Kohlenhydrate in den Reticulumzellen.

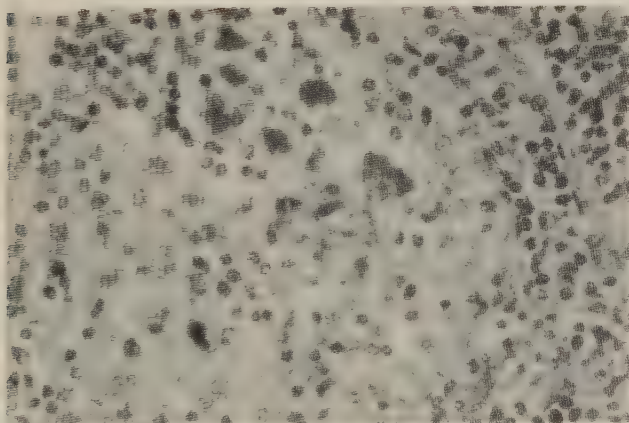
1. In Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparaten zeigen weder die Reticulumzellen der Sinus, noch die der Keimzentren auffällige Einschlüsse, mit Ausnahme gelegentlicher multipler Vacuolen, die ihnen dann das Aussehen von Pseudoxanthomzellen verleihen. Erst nach Anwendung der Perjodsäure-Leukofuchsin (PAS)-Reaktion stellen sich in ihrem Cytoplasma ohne Übereinstimmung mit der Vacuolenlokalisation unterschiedlich große kugelige Gebilde leuchtend rot dar.

Die PAS-Reaktion dient dem Nachweis von Kohlenhydraten.

Dabei werden die Hexosepolysaccharide mit Perjodsäure zu polymeren Aldehyden oxydiert und diese durch das Schiffsche Reagenz sichtbar gemacht.

Die Reaktion wurde im wesentlichen nach der Arbeitsvorschrift von HOTCHKISS und PEARSE durchgeführt und dabei die Schnitte entparaffiniert, in 70%-igen Alkohol eingebracht, mit Perjodsäure für die Dauer von 10 Min. oxydiert (Herstellung der Perjodsäure-Lösung: zu 400 mg Perjodsäure werden 10 ml destilliertes Wasser und 5 ml m 5 Natriumacetat gegeben. Dann mit reinem, absolutem Alkohol auf 50 ml auffüllen. Die Lösung muß bei 4° C im Dunkeln aufbewahrt werden und ist etwa 1-2 Wochen haltbar); danach Einbringen der Präparate in 70%-igen Alkohol, Behandlung mit reduzierender Lösung nach HOTCHKISS für 1 Min. (Herstellung der Hotchkiss-Lösung: zu 1,0 g Kaliumjodid und 1,0 g Natriumthiosulfat werden 30 ml reiner, absoluter Alkohol, 20 ml destilliertes Wasser und 0,5 ml 2n Salzsäure hinzugegeben. Der sich bildende Schwefelniederschlag kann vernachlässigt werden.); nochmals 70%-iger Alkohol, Behandlung mit Schiffschem Reagenz für die Dauer von 20 Min.; fließendes Wasser 20 Min.; Kernfärbung mit 0,5%-igem Mayerschem Hämalaun 3/4 Min.; Entwässern und Einbetten in Canada-Balsam.

Die Perjodsäure-Leukofuchsin-Färbung wurde an den Lymphknoten aller 52 Fälle angewandt, in 31 von ihnen fanden sich mehr oder minder reichlich die leuchtend roten kohlenhydrathaltigen kugeligen oder körnchenartigen Einschlüsse in den SR, aber auch den Reticulumzellen der Keimzentren und schließlich in Zellen, die sich durch ihren kleinen chromatinreichen Kern und das große Cytoplasma als Histiocyten deklarieren. Ihre morphologischen Besonderheiten zeigen sich am deutlichsten in den SR Abb. 3:



Hier liegen sie vereinzelt oder in Konglomeraten neben- und übereinander - was sich besonders an dicken Präparaten gut erkennen läßt - und sind scharf gegen das Cytoplasma abgegrenzt. Sie ähneln den Russelschen Körperchen und zeigen unterschiedliche Größe mit Durchmessern zwischen 0,5 und 6 μ). Daß sie tatsächlich Einschlüsse der SR und nicht anderer Zellen innerhalb der Sinus darstellen, läßt sich leicht aus deren Morphologie entscheiden.

Tabelle 2

Vergleich der Häufigkeit des Auftretens PAS-positiver Substanzen im
 Sinusretiothel mit der Art der histologischen Lymphknotenreaktionen
 und der Metastasenhäufigkeit bei verschiedenen Carcinom-Typen

Histologischer Charakter des Primärtumors	Fall- zahl	(histochemisch) PAS-positive Substan- zen in den SR	Histologische Reaktion des Lymphknoten		Metastasen
			reticulär	lymphatisch	
Reines Adeno- carcinom	4	3	3	3	2
Adenocarcinom mit soliden Anteilen	7	7	5	1	5
Solides Carcinom	39	19	27	13	24
Sonderformen	2	0	0	1	1
Sa.:	52	29	35	18	32

Tab. 2 gibt die Häufigkeit des Auftretens PAS-positiver Substanzen in den SR bei den verschiedenen Carcinomtypen wieder und berücksichtigt dabei gleichzeitig die jeweilige histologische Lymphknotenreaktion sowie eventuell vorhandene Metastasen.

Für die weitere histochemische Untersuchung der PAS-positiven granulären und kugeligen Zelleinschlüsse wurden nun 3 Fälle ausgewählt, in welchen diese besonders deutlich hervortraten.

Zuerst galt, es den Kohlenhydratcharakter dieser Substanzen zu beweisen und demnach Glykole von den ebenfalls PAS-positiven α -Aminoalkoholen und Äthylenverbindungen zu differenzieren. Das ist mit dem Acetylierungsverfahren nach McMANUS und CASON möglich. Dabei werden Glykole und α -Aminoalkohole durch die Einwirkung von Essigsäureanhydrid (in Pyridin) acetyliert und somit für die Perjodsäureoxydation blockiert. Die unter Umständen gleichfalls mit der PAS-Technik erfaßten Äthylenverbindungen bleiben frei und daher für die Perjodsäure oxydierbar. Daher kann man sie von Glykolen und Aminoalkoholen abtrennen.

Behandelt man nun die acetylierten Schnitte mit 0,1 n Kalilauge, so werden die veresterten Glykole verseift, die acetylierten Aminogruppen sind dagegen stabil und nicht mehr reaktionsfähig. Die nachfolgende PAS-Reaktion erfaßt deshalb nur die verseiften Glykole. So ist eine Unterscheidung zwischen Glykolen und Aminoalkoholen möglich.

Die Acetylierung und Verseifung wurde nach den Angaben von PEARSE und GEDIGK durchgeführt, die Schnitte in Wasser gebracht und bei Zimmertemperatur für 45 Min. in eine Essigsäureanhydrid-Pyridin-Lösung gestellt (13 ml Essigsäureanhydrid + 20 ml Pyridin), anschließend in Wasser spülen, dann PAS-Reaktion. Zum Verseifen haben wir (nach Acetylieren) die Schnitte in 0,1 n Kalilauge für die Dauer von 45 Min. bei Zimmertemperatur eingebracht. Anschließend wurden die Präparate in Wasser gespült und ebenfalls der PAS-Reaktion unterzogen.

Alle PAS-positiven Kugeln der SR zeigen nach Acetylierung mit der Perjodsäure-Leukofuchsin-Technik keine Anfärbbarkeit mehr. Demnach liegen offenbar Äthylengruppen, die auch nach Acetylierung für PAS anfärbbar bleiben, nicht vor. Nach **Acetylierung und Verseifung** ergibt die PAS-Reaktion stets das gleiche Bild, wie im unbehandelten Präparat. Aus diesen Überlegungen folgert, daß Glykole die Ursache der positiven PAS-Reaktion sind.

Obwohl nach vorausgegangener enzymatischer Glykogenolyse durch Diastase (in der Vorschrift von LILLIE und GRECO) oder nach Speichelverdauung die PAS-Reaktion keine sichtbaren Unterschiede zu unbehandelten Präparaten ergibt, lassen sich mit der Kaliumkarmin-Methode nach BEST und der Glykogendarstellung durch die Chromsäureoxydationstechnik nach BAUER spärliche feine Glykogengranula sichtbar machen, die nach Glykogenverdauung durch Diastase oder Speichel nicht mehr nachweisbar sind.

Demnach finden sich in den Reticulumzellen der Sinus und der Keimzentren sowie in den Histiocyten zwei verschiedenartige kohlenhydrathaltige Einschlüsse: einmal in ganz geringer ¹⁴menge Glykogengranula, zum anderen gröbere Granula und Kugeln unterschiedlicher Größe, die glykogenfreie (diastaseresistente) Kohlenhydrate beinhalten. Der genauere histochemische Charakter dieser Kohlenhydrate war nun zu prüfen, insbesondere ihre Veresterung mit Säureradikalen, ihre eventuelle Bindung an Fettsubstanzen und Eiweißkörper. Daneben galt, es die mögliche Beteiligung von Ribonucleinsäuren am Aufbau der kohlenhydrathaltigen Einschlüsse zu untersuchen.

Mit Alcianblau, das dem Nachweis mesenchymaler und epithelialer saurer Mucopolysaccharide dient, (STEEDMAN) ergaben die Kugeln keine Anfärbung.

Toluidinblau stellt sie ebenso wie das übrige Cytoplasma blaßblau dar. Metachromasie fand sich nicht. Sie heben sich daher nur bei Kenntnis ihrer Morphologie angedeutet im Cytoplasma hervor.

Nachdem sich die kugeligen Gebilde weder mit Alcianblau anfärben, noch mit Toluidinblau metachromatisch sind, konnte man kaum eine Reaktion mit Aldehydfuchsin erwarten. Die Bindung dieses rotvioletten Farbstoffes an Gewebsstrukturen bedeutet nach Untersuchungen von SCOTT und CLAYTON das Vorliegen von Säureestern (vorwiegend Sulfaten), wenn freie Aldehyde und bestimmte Proteine (wohl solche mit Disulfid- oder Sulfhydryl-Gruppen) ausgeschlossen werden können.

Der Ausfall dieser Reaktionen läßt nicht auf einen wesentlichen Gehalt an Säureestern in den untersuchten Kohlenhydraten schließen. Dem entspricht auch das Ergebnis der Basophilie-Messung. Hierbei wird die Bindefähigkeit einzeln er Gewebelemente für basische Farbstoffe geprüft (PISCHINGER). Entsprechend dem Einbau saurer Gruppen zeigt das Gewebe in gepufferten Lösungen von gleicher Farbstoff-, aber unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentration ein unterschiedliches Bindungsvermögen des Methylenblau. Als Maß für die Basophilie gilt diejenige Wasserstoffionenkonzentration, bei der die sichtbare Bindefähigkeit für Methylenblau erlischt (PEARSE).

Den Angaben von DEMPSEY u. Mitarb. sowie PEARSE entsprechend haben wir 5×10^{-4} m Methylenblau-Lösungen benutzt, die mit Glykokoll- bzw. Acetat- oder Phosphatpuffern auf das jeweilige pH eingestellt worden waren. Die gepufferten Farbstofflösungen hatten eine Ionenstärke von 0,01. Die Schnitte wurden für 24 Std. bei $20 \pm 1^{\circ}$ C in diese Methylenblau-Lösungen eingebracht, anschließend schnell entwässert und in Canada-Balsam eingeschlossen.

Die für Kohlenhydratuntersuchungen störende starke Basophilie der Nucleinsäuren mußte in einer parallelen Untersuchungsreihe durch RNS-Hydrolyse mittels $1N$ HCl (2 Std.) ausgeschaltet werden. Die Kohlenhydrate erleiden dabei keine Veränderungen wie frühere Untersuchungen von GEDIGK und STRAUSS gezeigt haben.

Nach Entfernung der Nucleinsäuren ergaben die PAS-positiven Kugeln in den SR keine Methylenblau-Bindung unter pH 4,0. In Verbindung mit den übrigen Reaktionen läßt sich schließen, daß diese diastaseresistenten Kohlenhydrate nicht säureverestert sind. Auf ihre histoenzymatische Analyse durch Hyaluronidase konnte daher verzichtet werden.

2. Nachweis von Fettsubstanzen

Zum Nachweis der Lipide wurden die Präparate mit Sudan-Schwarz (= Ceres-Schwarz) nach LISON gefärbt.

Dazu verblieben sie 30 Min. in einer gesättigten Lösung dieses Farbstoffes, der in 70%-igem Alkohol gelöst war. Kernfärbung mit Kernechtrot.

Danach geben einzelne der PAS-positiven Kugeln einen ganz schwachen Grauton im Paraffinpräparat. Die Beurteilung der Sudan-Schwarz-Färbung am Gefrierschnitt ist wegen der erheblichen Schnittdicke gerade bei Lymphknoten außerordentlich schwierig und gab kein eindeutiges Ergebnis. Ähnliches gilt für Nativpräparate, die mit Hilfe des Kryostaten hergestellt werden.

Mit der Perameisensäure-Leukofuchsin-(Pfas) Reaktion lassen sich Äthylenverbindungen nachweisen. Sie werden durch Perameisensäure oxydiert und die entstehenden Aldehyde mit fuchsin-schwefliger Säure (LILLIE) dargestellt.

Das Verfahren haben wir nach den Angaben von Lillie durchgeführt, die entparaffinierten Schnitte in Wasser eingebracht und anschließend mit Perameisensäure-Lösung 90 Min. bei Zimmertemperatur behandelt (Herstellung der Perameisensäure-Lösung: zu 8 ml 90%-iger Ameisensäure werden 31 ml 30%-iges Wasserstoffsuperoxyd und 0,22 ml konzentrierte Schwefelsäure gegeben. Da sich die Hauptmenge der Persäure erst nach 1 1/2 Std. bildet, wird das Reagenz 30 Min. vor Gebrauch angesetzt und muß für jeden Versuch neu hergestellt werden.). Danach Spülen unter fließendem Wasser für 10 Min., Schiffsches Reagenz 20 Min., anschließend 3-mal Spülen in 0,5%-iger Natriumbisulfit-Lösung für je 2 Min..

Nach weiterem Abspülen in fließendem Wasser Kernfärbung mit Hämalaun wie bei der PAS-Reaktion.

Die Perameisensäure-Leukofuchsin-Behandlung ergibt in den kohlenhydrathaltigen Kugeln der SR keine Anfärbung. Freie Äthylenverbindungen (z.B. als Zeichen ungesättigter Fettsäuren) finden sich demnach nicht.

Nach 12-stündiger Einwirkung von Chloroform-Methylalkohol bei 65⁰ C zur Entfernung eventuell vorhandener Lipide zeigt die PAS-Reaktion die gleiche Stärke wie ohne diese Vorbehandlung.

Eine Doppelbrechung innerhalb der PAS-positiven Kugeln ergibt sich nicht.

3. Nachweis von Proteinen

Die gekuppelte Tetrazonium-Reaktion (LISON, DANIELLI) gilt als Nachweis für Proteine, bzw. bestimmte in diesen enthaltene Aminosäuren.

Nach Einbringen in Wasser werden die Paraffinschnitte für die Dauer von 15 Min. in frisch tetrazotiertes Benzindin gebracht. (Herstellung des Benzidins siehe Angaben von PEARSE.) Die tetrazotierte Benzidin-Lösung muß stets neu angesetzt werden, da sie sich sehr rasch zersetzt. Danach werden die Schnitte in 3 Wechseln von Veronal-Acetat-Puffer bei pH 9,2 gewaschen und dann in gesättigte (1 g in 50 ml) Lösung von H-Säure in Veronal-Acetat-Puffer bei pH 9,2 für 15 Min. überführt. Nachfolgendes Waschen in Wasser für 3 Min., Dehydrieren in der aufsteigenden Alkoholreihe, Xylol, Einbettung in Canada-Balsam.

Die Reaktion stellt im Gewebsschnitt die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Histidin und nach DANIELLI unter Umständen auch purin- und pyrimidinhaltige Verbindungen in braun-rotem Farbton dar. Durch 10%-iges Benzoylchlorid in trockenem Pyridin können die aromatischen Aminosäuren für die Kupplungsreaktion blockiert werden. Die danach noch positive Reaktion spricht für das Vorliegen von purin- oder pyrimidinhaltigen Verbindungen oder gilt als Ausdruck einer besonderen räumlichen Anordnung der Proteine.

Für den Benzoylierungsvorgang wurden Paraffinschnitte in Petroläther entparaffiniert, anschließend luftgetrocknet und für 5-10 Min. im Brutschrank erhitzt (60°C). Die trockenen Präparate werden für 16-24 Std. in eine 10%-ige Benzoylchlorid-Lösung in trockenem Pyridin eingebracht. Nur unbedingt wasserfreies Pyridin garantiert die regelrechte Reaktion. Wir haben es daher über Bariumoxyd getrocknet. Nach Entnahme der Präparate aus der Benzoylchlorid-Lösung werden sie in absolutem Aceton gespült, anschließend in absoluten Alkohol gebracht und dann in Wasser überführt. Die gekuppelte Tetrazonium-Reaktion wird angeschlossen.

Die gekuppelte Tetrazonium-Reaktion ergibt nun sowohl eine rotbraune Anfärbung des Cytoplasmas als auch der darin liegenden kohlenhydrathaltigen Kugeln. Infolgedessen treten sie dabei nicht als morphologisch auffällige Gebilde hervor. 24-stündige Einwirkung von 10%-igem Benzoylchlorid hat die Reaktionsfähigkeit für tetrazotiertes Benzidin bis auf gelegentliche Reste in den Randpartien der Kugeln aufgehoben.

Man darf daher Vorhandensein der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan sowie Histidin in den kohlenhydrathaltigen Einschlüssen der SR annehmen. Die nach ihrer Blockierung durch Benzoylchlorid in den Randpartien der Kugeln noch gelegentlich schwach positive Reaktion läßt hier purin- und pyrimidin-haltige Verbindungen vermuten (s.o.) oder kann der Ausdruck einer besonderen räumlichen Anordnung der Proteine sein. Die Kohlenhydrate sind demnach an Eiweiß gebunden.

4. Nachweis von Nucleinsäuren

Mit Hilfe der Feulgen-Reaktion (nach Romeis §1233) ließ sich erwartungsgemäß zeigen, daß die untersuchten Kohlenhydrate keine Desoxyribonucleinsäuren (DNS) enthalten.

Demgegenüber stellt Methygrün-Pyronin die Kugelbildungen innerhalb des rötlich angefärbten RNS-haltigen Cytoplasmas als Aufhellungen dar, die aber in den Randpartien eine stärkere RNS-Verdichtung zeigen.

Die Gallocyanin-Chromalaun-Methode zum Nachweis von Nucleinsäuren ergibt ein ähnliches Bild. Hier treten die kugeligen Bildungen innerhalb der tiefblauen Anfärbung des nucleinsäurehaltigen Cytoplasmas blaßblau hervor und lassen ebenfalls in ihrem Randbezirk zum Cytoplasma eine RNS-Häufung erkennen. Es ist daher damit zu rechnen, daß Ribonuclein-säuren zumindest am Aufbau der Oberfläche dieser Kugeln beteiligt sind.

Schließlich wurde der Nachweis von Amyloid mit Kongorot sowie der von Eisen mit der Berliner-Blau-Reaktion versucht. Für beide Reaktionen sahen wir nie ein positives Ergebnis.

Demzufolge stellen daher die PAS-positiven granulären und kugeligen Einschlüsse in den Reticulumzellen der Lymphknoten glykogenfreie (diastaseresistente) Polysaccharide dar, die an Eiweißkörper gebunden, aber nicht mit Säureradikalen verestert sind. Es handelt sich daher um neutrale Mucopolysaccharide bzw. Glykoproteide oder Mucoproteide, die von einem RNS-Mantel umschlossen werden. Eine Unterscheidung zwischen Glykoproteiden und Mucoproteiden ist histochemisch nicht mehr möglich, da sie nur im Hexosamingehalt differieren, was sich histochemisch bislang nicht darstellen läßt. Daß diesen Verbindungen zwischen Eiweiß und Kohlenhydraten solche zwischen Fett und Kohlenhydraten beigemischt sind, ist nach den Ergebnissen der Fettfärbungen unwahrscheinlich, kann aber nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Neben diesen Kohlenhydraten enthalten einzelne Reticulumzellen auch geringe Mengen Glykogen in Form von feinen Granula.

B. Histochemischer Charakter der Kohlenhydrate im Primärtumor

Zur Frage der Genese PAS-positiver Einschlüsse in den SR war es bei der Möglichkeit ihres Antransportes aus zer-

fallenden Carcinomzellen oder dem bindegewebigen Stroma notwendig, den Primärtumor auf Kohlenhydrate und deren histochemischen Charakter zu untersuchen.

1. Kohlenhydrate des Tumorepithels

Dazu wurde die PAS- und Diastase-PAS-Reaktion an allen Präparaten des Primärtumors durchgeführt. In 30 der 52 untersuchten Fälle ließen sich Kohlenhydrate in unterschiedlicher Menge im Tumorparenchym nachweisen. In den undifferenzierten Tumoranteilen treten sie als feine Granula und größere Tropfen innerhalb der Zellen auf, in drüsigen Bildungen darüber hinaus streifenförmig im apikalen Epithelrand und schließlich auch im Drüsenlumen. Dabei sind die histochemischen Reaktionen der intra- und extrazellulären Kohlenhydrate gleich: sie enthalten kein Glykogen und sind an Eiweißkörper gebunden. Wie die Glykoproteide der SR des Lymphknotens werden sie durch Acetylierung PAS-negativ, nach Acetylierung und Verseifung jedoch wieder durch die Perjodsäure-Leukofuchsin-Technik darstellbar. Daher ist die positive PAS-Reaktion auch hier auf Glykole zurückzuführen.

Fettsubstanzen, die der Lokalisation der kohlenhydrathaltigen Granula und Tropfen intra- und extrazellulär entsprächen, konnten wir nicht nachweisen. Die Reaktionen auf Nucleinsäuren waren negativ.

Abweichend von den Kohlenhydraten in den Lymphknoten zeigen aber nun die des Tumorparenchyms eine deutliche Anfärbung mit Alcianblau, eine positive Aldehydfuchsin-Reaktion und zuweilen eine schwache γ Metachromasie nach Färbung mit Toluidinblau.

Ihre Methylenblau-Bindung reicht maximal bis pH 3,5 - 3,8. Die glykogenfreien Kohlenhydrate des Tumorparenchyms stellen demnach schwach saure Mucopolysaccharide dar; im Unterschied zu denen der Lymphknoten sind sie demnach mit Säureradikalen verestert.

2. Kohlenhydrate des Tumorstromas

Die Stroma-Kohlenhydrate sind mit der PAS-Reaktion meist nur schwach, evtl. auch gar nicht anfärbbar. Die geringe Intensität der Rotfärbung des Stromas nach PAS-Reaktion ändert sich durch seine Vorbehandlung mit Diastase nicht. Glykogen enthält das Tumorstroma demnach nicht, was auch die Glykogen-Nachweise nach BEST und BAUER zeigen. In ihrem Verhalten bei Acetylierung und Verseifung entsprechen sie **den Kohlenhydraten des Tumorparenchyms und der Lymphknoten.**

Demnach liegen im Stroma nur diastaseresistente 1,2 Glykole vor, die durch die PAS-Reaktion auffallend schwach angefärbt werden.

Im Gegensatz dazu steht ihre starke Anfärbung mit Alcianblau und Aldehydfuchsin sowie eine deutliche γ Metachromasie von Toluidinblau. Die Basophilie dieser Kohlenhydrate reicht nach Entfernung der Ribonucleinsäuren bis unter pH 2,8.

Durch histoenzymatische Analyse mit Hyaluronidase lassen sich alle diese Reaktionen paralysieren. Die Wirkung dieses **Fermentes** ist bei **histochemischer Anwendung allein auf saure Mucopolysaccharide mesenchymaler Herkunft** begrenzt; epitheliale werden nicht angegriffen. Somit kann man die mesenchymalen Polysaccharide aus dem Schnitt eliminieren und damit im indirekten Verfahren (LAVES) nachweisen.

Wir haben die Hyaluronidase als 0,2%-ige Lösung (Kinetin Schering) angewandt, der 0,9 % Kochsalz zugesetzt worden war. Das pH der Fermentlösung beträgt dann 5,8. Die Schnitte werden 24 Std. lang bei $37 \pm 1^{\circ} \text{C}$ bebrütet. Die Aktivität der verwendeten Hyaluronidase läßt sich leicht sichern, indem man sie auf Trachealknorpel von Kontrollschnitten einwirken läßt und die Abnahme der Basophilie beobachtet. Weitere Kontrolluntersuchungen sind mit hyaluronidasefreien Kochsalzlösungen notwendig, um die Möglichkeit einer unspezifischen Wirkung der Fermentlösung auszuschalten.

Die schwache PAS-Reaktion der Stroma-Kohlenhydrate, die sehr deutlichen Nachweise für säureveresterte Mucopolysaccharide und besonders die starke Basophilie sowie ihre histoenzy-

Tabelle 3

Histochemischer Vergleich der Kohlenhydrate in Tumor-
parenchym, Tumorstroma und Lymphknotenretothel

Reaktion	Lymphknoten Einschlüsse der SR	Primärtumor		
		Parenchym		Stroma
		Zelle	Sekret	
PAS-Reaktion	+	+	+	(+) ϕ
Diastase-PAS-Reaktion	+	+	+	(+) ϕ
PAS-Reaktion nach Acetylierung	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ
PAS-Reaktion nach Ace- tylierung u. Verseifung	+	+	+	(+) ϕ
Aldehydfuchsin	ϕ	+	+	+
Alcianblau	ϕ	+	+	+
Metachromasie mit Toluidinblau	ϕ	(+)	(+)	+
Basophilie nach HCl	über pH 5,0	pH 3,8	pH 3,8	unter pH 2,8

matische Entfernung durch Hyaluronidase sprechen für das Vorliegen von Hyaluronsäure (oder auch Chondroitinschwefelsäure, die nach MEYER ebenfalls durch Hyaluronidase angegriffen werden soll).

Dabei macht die erhebliche Säureveresterung dieser Kohlenhydrate die relativ schwache PAS-Reaktion verständlich, da der Perjodsäure nicht mehr genügend benachbarte freie OH-Gruppen, die sich in Aldehyde überführen lassen, zur Verfügung stehen.

Erwartungsgemäß lassen sich die Kohlenhydrate im Tumorepithel, als epitheliale Polysaccharide, durch Hyaluronidase enzymatisch nicht entfernen.

Eine Übersicht des Verhaltens der Kohlenhydrate in Lymphknoten, Tumorparenchym und Tumorstroma gibt Tbl. 3.

C. Zur Frage der Entstehung der kohlenhydrathaltigen Einschlüsse in den Reticulumzellen der Lymphknoten

Glykoproteide im Reticulum von Lymphknoten, in deren Quellgebiet kein Carcinom bestand, werden hierund da beschrieben, aber in ihrer Entstehung unterschiedlich gedeutet. So vertritt PIRANI die Anschauung, daß Krankheitsvorgänge, die mit einem Abbau der Grundsubstanz des Bindegewebes einhergehen, den Glykoproteidspiegel des Blutes erhöhen, wobei diese depolymerisierten Kohlenhydrate später in den Reticuloendothelzellen abgelagert werden sollen. Dieser Ansicht sehr nahe kommt die Auffassung von JUSTIN-BESANÇON u. Mitarb., die 1955 über PAS-positive Ablagerungen in den Lymphknoten bei chronischer Polyarthrits berichteten und diese als kleine Tropfen in den SR, als große in der Pulpa und als größere Ansammlungen in den Sekundärknötchen beschreiben. Auch sie treten für die Ablagerung "depolymerisierter saurer Mucopolysaccharide" ein, die außer positiver PAS-Reaktion orthochromatische Blaufärbung mit saurer Toluidin-

blau-Lösung bei pH 2,0 zeigen. LENNERT bestätigt diese Befunde und hält sie möglicherweise allgemein für einen Hinweis auf chronische Polyarthrit.

In die gleiche Richtung dürften auch Beobachtungen von FABER deuten, der bei eitrigen infektiösen Erkrankungen ein Ansteigen des Serumglukosamingehaltes fand und die Ansicht vertritt, daß dieses Kohlenhydrat später im Gewebe als Amyloid abgelagert würde. Amyloid ist aber eine den Glykoproteiden nahestehende Substanz.

Demgegenüber sieht TEILUM in den nach Injektion von artfremdem Eiweiß (Casein) innerhalb der Retothelien auftretenden Kohlenhydraten keine Speichersubstanzen, sondern Bildungen der Zellen selbst. Er stellt sie dem Amyloid gleich, das er mit den Glykoproteiden und Mucoproteiden identifiziert. Unter dieser Vorstellung betrachtet er ihre Entstehung als eine Entgleisung der normalen Eiweißsynthese in den Retothelzellen (und ihren Abkömmlingen, den Plasmazellen) unter dem Einfluß von Nebennierenrindenhormonen und Ascorbinsäure.

Die von uns im Lymphabflußgebiet von Mamma-Carcinomen beobachteten Kohlenhydrate in den SR sind den beschriebenen Substanzen aller genannten Autoren grundsätzlich ähnlich. Es ergibt sich daher die gleiche Fragestellung, nämlich ob sie Eigenbildungen der Zelle selbst oder aber Ablagerungen aus dem Quellgebiet der Lymphknoten darstellen.

Dafür war es erforderlich zu untersuchen, ob die Kohlenhydrate von Tumorstroma und Tumorparenchym mit denen der SR identisch sind oder nicht, oder ob sie phagocytierte Abbauprodukte aus dem Tumorbereich sein können.

1. Zur Frage der Ablagerung von Kohlenhydraten
aus dem Tumorbereich in den SR

Die histochemische Analyse ergab (Tb1.3, daß die im Tumorparenchym, Tumorstroma und den Lymphknoten gefundenen Kohlenhydrate unterschiedlichen Charakter aufweisen, sie sind:

- a. in den SR als neutrale Mucopolysaccharide
- b. im Tumorparenchym als schwach saure Mucopolysaccharide
- c. und im Tumorstroma als hochgradig säureveresterte Mucopolysaccharide vom Hyaluronsäure- oder Chondroitinschwefelsäuretyp

zu bezeichnen.

Es wäre nun vorstellbar, daß weitgehend säureveresterte Kohlenhydrate aus dem Tumorbereich depolymerisiert und in die SR aufgenommen würden. Dann müßte man hier aber niedrigere Polymerisationsstufen saurer Mucopolysaccharide nachweisen können.

Nach Untersuchungen von STRAUSS am Endometrium scheint eine solche Unterscheidungsmöglichkeit zwischen nieder- und hochpolymeren säureveresterten Kohlenhydraten einerseits durch ihre unterschiedliche Alcianblau- und Aldehydfuchsinanfärbung, andererseits durch ihre Toluidinblau-Metachromasie gegeben zu sein. Niederpolymere saure Mucopolysaccharide sind Alcianblau- und Aldehydfuchsin-positiv, aber im Gegensatz zu den hochpolymeren nicht Toluidinblau (oder Azur A) metachromatisch. Daher scheint die metachromatische Farbreaktion nicht nur ein Ausdruck der Farbstoffpolymerisation zu sein, sondern auch in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad des Substrates selbst zu stehen.

Dafür spricht auch der von MEYER nachgewiesene Metachromasieverlust mesenchymaler saurer Mucopolysaccharide nach enzymatischer Depolymerisation.

Es kann sich aber bei den Kohlenhydraten der SR nicht um

Tabelle 4

52 Fälle - Vorkommen PAS-positiver Substanzen

=====

Ort		Zahl	davon gleichzeitig im Tumorparenchym
Lymphknoten	Sinusretothel allein	(+) 8 + 6 22 ++ 4 +++ 4	5 4 13 3 1
	Keimzentrum allein	2	1
	gleichzeitig in Sinusretothel u. Keimzentrum	7	5
PAS-positive Substanzen im Lymphknoten 31			19-mal gleich- zeitig im Tu
Tumor allein	11		

1. Zur Frage der Ablagerung von Kohlenhydraten

aus dem Tumorbereich in den SR

Die histochemische Analyse ergab (Tbl. 3, daß die im Tumorparenchym, Tumorstroma und den Lymphknoten gefundenen Kohlenhydrate unterschiedlichen Charakter aufweisen, sie sind:

- a. in den SR als neutrale Mucopolysaccharide
- b. im Tumorparenchym als schwach saure Mucopolysaccharide
- c. und im Tumorstroma als hochgradig säureveresterte Mucopolysaccharide vom Hyaluronsäure- oder Chondroitinschwefelsäuretyp

zu bezeichnen.

Es wäre nun vorstellbar, daß weitgehend säureveresterte Kohlenhydrate aus dem Tumorbereich depolymerisiert und in die SR aufgenommen würden. Dann müßte man hier aber niedere Polymerisationsstufen saurer Mucopolysaccharide nachweisen können.

Nach Untersuchungen von STRAUSS am Endometrium scheint eine solche Unterscheidungsmöglichkeit zwischen nieder- und hochpolymeren säureveresterten Kohlenhydraten einerseits durch ihre unterschiedliche Alcianblau- und Aldehydfuchsinanfärbung, andererseits durch ihre Toluidinblau-Metachromasie gegeben zu sein. Niederpolymere saure Mucopolysaccharide sind Alcianblau- und Aldehydfuchsin-positiv, aber im Gegensatz zu den hochpolymeren nicht Toluidinblau (oder Azur A) metachromatisch. Daher scheint die metachromatische Farbreaktion nicht nur ein Ausdruck der Farbstoffpolymerisation zu sein, sondern auch in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad des Substrates selbst zu stehen.

Dafür spricht auch der von MEYER nachgewiesene Metachromasieverlust mesenchymaler saurer Mucopolysaccharide nach enzymatischer Depolymerisation.

Es kann sich aber bei den Kohlenhydraten der SR nicht um

Tabelle 4

52 Fälle - Vorkommen PAS-positiver Substanzen
=====

Ort		Zahl	davon gleichzeitig im Tumorparenchym
Lymphknoten	Sinusretothel allein	(+) 8 + 6 22 ++ 4 +++ 4	5 4 13 3 1
	Keimzentrum allein	2	1
	gleichzeitig in Sinusretothel u. Keimzentrum	7	5
PAS-positive Substanzen im Lymphknoten 31			19-mal gleich- zeitig im T
Tumor allein	11		

niederpolymere saure Mucopolysaccharide handeln, da ihnen neben der Metachromasie auch die Alcianblau- und Aldehydfuchsinreaktion fehlen. Um diese neutralen Mucopolysaccharide dennoch als resorbierte Abbauprodukte des Tumors auffassen zu können, bliebe nur die- zumindest für die Hyaluronsäure äußerst unwahrscheinliche-Annahme, daß zugleich auch eine vollständige Abspaltung der Säureradikale erfolgt wäre.

Gegen diese Ansicht einer Resorption (und evtl. Resynthese) von Kohlenhydratspaltprodukten spricht auch, daß ihr Auftreten in Lymphknoten und Tumorparenchym keinesfalls stets synchron geht (Tbl. 4). Von den 31 Fällen mit Kohlenhydraten in den Lymphknoten zeigen nur 19 gleichzeitig Mucoide im Tumorparenchym, die (s.o.) für einen Abbau in Frage kämen. Umgekehrt sind nicht stets, wenn im Tumorgewebe Kohlenhydrate nachgewiesen werden können, solche auch im Lymphknoten vorhanden, eher im Gegenteil.

2. Zur Frage ihrer Entstehung als Reaktionsprodukt der Retothelzellen

Danach scheint berechtigte Veranlassung gegeben, sich der Meinung von TEILUM anzuschließen und die Kohlenhydrate für ein Reaktionsprodukt der Retothelzellen selbst zu halten. Die nahe Verwandtschaft der Retothel- mit - zumindest einer Form der- Plasmazellen wirft dann die Frage auf, ob diese Kohlenhydrat-Eiweiß-Verbindungen evtl. Antikörpercharakter haben.

Diese Überlegung liegt nahe, nachdem PEARSE Zelleinschlüsse der Plasmazellen, die sogenannten Russelschen Körperchen, als Mucopolysaccharide identifizieren konnte, also Substanzen, die den von uns in den Retothelzellen gefundenen sehr ähnlich sind (Tbl. 5). Daran ändern die Untersuchungsergebnisse von GRUNDNER-CULEMANN und DIEZEL nichts, die

Tabelle 5

Histochemischer Vergleich zwischen den Einschlüssen der SR und
den Russelschen Körperchen

Reaktion	Einschlüsse der SR	Russelsche Körperchen
PAS-Reaktion	+	+ (+) ϕ
Diastase-PAS-Reaktion	+	+ (+) ϕ
PAS-Reaktion nach Acetylierung	ϕ	ϕ
PAS-Reaktion nach Acetylierung u. Verseifung	+	+ (+) ϕ
Metachromasie mit Toluidinblau	ϕ	ϕ
Basophilie nach HCl	pH 4,0	pH 4,3
Sudan-Schwarz	ϕ (?)	+ (+)
Pfas-Reaktion	ϕ	ϕ
PAS-Reaktion nach Chloroform-Methylalkohol	ϕ	ϕ
Gekuppelte Tetrazonium-Reaktion	+	+
Gekuppelte Tetrazoniumreaktion nach Benzoylierung	(+)	+ (+)
Feulgen-Reaktion	ϕ	ϕ
Methylgrün-Pyronin-Färbung	(+)	+
Gallocyanin-Chromalaun-Färbung	(+)	+

glauben, in den Russelschen Körperchen daneben noch eine lipoidkomponente nachgewiesen zu haben und daher zusätzlich Glykolipide annehmen, die auch wir nicht sicher ausschließen können.

Der ähnliche histochemische Aufbau der Kohlenhydrate von Plasma- und Retothelzellen könnte an gleiche Aufgabe beider Zellarten denken lassen.

Über ihre funktionelle Bedeutung gehen aber - trotz gemeinsamer Herkunft aus der Reticulumzelle - die Ansichten auseinander. So will EHRICH in fast lückenloser Beweiskette nachgewiesen haben, daß die Plasmazellfunktion in der Bildung serologisch nachweisbarer Antikörper besteht. Er stellt die spezifische Leistung dieser Zellen noch dadurch besonders heraus, daß er die gegensätzliche Ansicht von FAGRAEUS, eine Reticulumzelle könne sich nach Antigenaufnahme und dessen Verarbeitung in eine Plasmazelle umwandeln, bezweifelt. FAGRAEUS läßt demnach das Primat der Plasmazellen in der Antikörperbildung nicht gelten und glaubt vielmehr, daß alle Zellen mit entsprechendem Kern- und Plasmaaufbau dazu befähigt seien. Ja, er verlegt diese Funktion sogar bewußt in die Plasmazellvorstufen und schreibt der reifen, Russelsche Körperchen enthaltenden, Plasmazelle nur die Funktion eines "Pensionärs" zu.

LENNERT und andere Autoren (MEYER-ARENDT, MOESCHLIN) stimmen mehr mit der Ansicht von EHRICH hinsichtlich der Antikörperbildung in den Plasmazellen überein, wollen aber für die reticulo-histiocytären Zellen mehr deren phagocytär-resorptiven Eigenschaften hervorgehoben wissen.

Unter diesen Vorstellungen lassen sich unsere eigenen Untersuchungsergebnisse am ehesten dahingehend deuten, daß die Retothelzellen körperfremdes Tumoreiweiß aufnehmen und mit Kohlenhydraten koppeln. Diese Ansicht erhält durch die experimentellen Untersuchungen von TEILUM mit Casein-Lösungen an Mäusen und Schweinen eine erhebliche Unterstützung. Vielleicht darf man in diesen Vorgängen ähnliche

Mechanismen der Bindung zellfremder durch zelleigene Substanzen sehen, wie sie GEDIGK und STRAUSS für hämosiderinbildende Mesenchymzellen beschrieben haben, die eisenhaltige Abbauprodukte des Blutfarbstoffes aufnehmen und durch Bildung saurer Mucopolysaccharide paralysieren. Dann allerdings ist das Auftreten der Kohlenhydrate in den SR kaum als ein immunbiologischer Vorgang anzusehen, sondern eher als Reaktion, um zellfremdes Tumoreiweiß zu neutralisieren; denn Antikörperbildung müßte die Entstehung des gesamten Glykoproteids (Kohlenhydrat und Eiweißkomponente) als Zellprodukt bedeuten.

So betrachtet, sind die Kohlenhydrate der SR nur ein Ausdruck der Filterfunktion des Lymphknotens und sollen den Organismus vor der schädigenden Wirkung der abgebauten Eiweißsubstanzen des Tumors schützen, stellen aber nicht gegen das Tumorstadium gerichtete immunbiologische Substanzen dar.

III. Bestehen Beziehungen zwischen Sinusretothelkohlenhydraten und anatomischer Lymphknotenreaktion und lassen diese Schlüsse auf die Tumorprognose zu?

Unter den genannten Gesichtspunkten mußte es von Interesse sein, in welchem Verhältnis das Auftreten der Glyko- oder Mucoproteide in den SR zu den allgemeinen Reaktionen der regionären Lymphknoten steht, die im Schrifttum häufig für prognostische Schlüsse auf das Tumorgeschehen herangezogen werden.

So beurteilt WUKETICH als günstig das Vorkommen von Sinusendothelreaktionen, lymphatischer Hyperplasie und epitheloidzelligen Reaktionen mit Riesenzellen vom Langhans oder Fremdkörpertyp. Vor allem letztere sieht er als histologisches Äquivalent einer Antigen-Antikörper-Bildung. WARTMANN beobachtete bei Patienten mit Sinuszellhyperplasie

seltener Metastasen und eine bessere Prognose; bei ihrem Fehlen meist nur Überlebenszeiten unter 3 Jahren. Die Reaktion der SR sieht er als eine Art Resistenz an, die mit Fortschreiten des Tumors geringer wird. Die Ansichten von BLACK, KERPE und SPEER ; BLACK, OPLER und SPEER, die 179 Fälle 5 Jahre oder bis zum Tode verfolgten, liegen auf derselben Ebene.

BLACK und SPEER untersuchten die Lymphknotenreaktionen von 270 Patienten mit Carcinomen verschiedener Organe und fanden bei 5-jähriger Überlebenszeit hyperplastische Lymphknoten mit nichtvakuoligen SR.

Auf Grund solcher und ähnlicher Beobachtungen sehen sie die SR als Träger von Immunkörpern an und betrachten wie SPIGOLON ihre Hyperplasie als eine Abwehrreaktion.

LEIDENIUS zieht hieraus sogar für die operative Carcinom-Therapie Folgerungen, indem er bei der evtl. wichtigen Abwehrfunktion der regionären Lymphknoten das Sinnvolle ihrer Ausräumung im Rahmen der Radikaloperationen (wie z.B. an der Mamma oder am Collum bei Wertheim-Meigs oder Schauta-Mitra) in Frage stellt. Dabei wäre es gleichgültig, ob sie Immunkörper bilden oder eine Reizantwort auf Tumorzerfallsprodukte darstellen. Jedenfalls wird von den meisten Autoren- im Gegensatz zu den Ansichten von FIORE-DONATI und TALLARIGO, die darin keine spezifische Reaktion oder Abwehr gegen das Krebsgeschehen sehen- das Auftreten solcher Lymphknotenveränderungen als günstig, ihr Fehlen als " signum mali ominis" betrachtet.

Allerdings finden sich Unterschiede in der Beurteilung und damit auch prognostischen Bewertung der Sinushistiocytose insofern, als eine aktive(reine Histiocytose) von einer passiven (mit Entzündungszellen durchsetzten) Form unterschieden werden. Dabei könnten entzündliche Veränderungen im Lymphknotenquellgebiet durch vorausgegangene Probeexzisionen aus dem Tumor zu Fehlurteilen geführt haben, die meist nicht berücksichtigt oder zumindest nicht erwähnt werden.

Tabelle 6

Lymphknotenreaktionen der nach (mindestens) 3 Jahren Beobachtung
überlebenden (22) und verstorbenen (16) von 38 Patientinnen

ÜBERLEBEND 22		VERSTORBEN 16	
Metastasen	Lymphknotenreaktion	Metastasen	Lymphknotenreaktion
	anatomische		anatomische
12	PAS-pos.Subst.	14	PAS-pos.Subst.
	SR allein 7		SR allein 3
	lymphat.allein 1		lymphat.allein 0
	Mischform 0		Mischform 2
keine Metastasen	keine Reakt. 4	keine Metastasen	keine Reakt. 9
	positive Reakt. 8		positive Reakt. 5
10	SR allein 3	2	SR allein 2
	lymphat.allein 1		lymphat.allein 0
	Mischform 5		Mischform 0
	keine Reakt. 1		keine Reakt. 0
Positive Reaktionen:	positive Reakt. 9		positive Reakt. 2
17		7	
12		5	

Zum Ausschluß derartiger Fehlermöglichkeiten haben wir aus einem weit größeren Krankengut nur die Lymphknoten von Radikaloperationen der Mamma untersucht, bei denen Sekundärreaktionen durch vorausgegangene Probeexzisionen entfielen. Gegenüber dem im Schrifttum meist größeren Material blieben dann nur 52 Fälle, bei denen einzzeitig mit Schnellschnitt (s.o.) operiert worden war. Da die Lymphknotenreaktionen hier aber nur als vom Carcinomgeschehen abhängig zu betrachten sind, ist die Aussage dieser Fälle relativ groß. Es wurden nun zuerst alle jenen Fälle zusammengestellt, bei denen zumindest die Dreijahresgrenze nach der Radikaloperation erreicht ist und für die Überlebenden und Verstorbenen die Häufigkeit von Metastasen, die anatomische und histochemische Reaktion in den Lymphknoten des Operationspräparates untersucht (Tbl. 6).

Drei Jahre nach der Operation sind von 38 Patientinnen nur 22 (=58%) am Leben, 16 (=42%) verstorben. Dabei gilt es natürlich zu bedenken, daß ein Teil dieser Frauen schon die 5-Jahresgrenze überschritten hat, während ein anderer die 3-Jahresgrenze eben erreichte. Die Zahlenangaben können sich daher noch etwas verschieben. Erwartungsgemäß hatten von den 22 überlebenden Frauen nur 12, von den verstorbenen 16 Patientinnen jedoch 14 bereits Lymphknotenmetastasen.

Für die Beurteilung der histologischen Lymphknotenreaktion haben wir als positiv die Wucherung der SR allein, die solitäre lymphatische Reaktion und Mischform von beiden **gewertet und der fehlenden Reaktion des Lymphknotens gegenübergestellt**. Bei den überlebenden 22 Frauen fanden sich 12-mal Lymphknotenmetastasen des Primärtumors, 10-mal fehlten solche. Sofern Lymphknotenmetastasen bestanden, waren die positiven Lymphknotenreaktionen (8) gegenüber den negativen (4) seltener als wenn Metastasen fehlten (Verhältnis positiv zu negativ = 9:1). Insgesamt ergab sich bei allen überlebenden Frauen (ohne Berücksichtigung der Metastasen) in 17 Fällen (=77%) eine positive histologische Lymphknotenreaktion. Die Bedeutung einer derartigen Reaktion

für die Verlaufsprognose des Carcinoms wird schon hieraus-
trotz des relativ kleinen Materials- deutlich.

Das zeigt sich ebenso bei den verstorbenen (16) Patienten, wo
sich im Operationspräparat 14-mal Metastasen und dabei in
9 Fällen keine und nur in 5 Fällen (= 44%) positive histo-
logische Reaktion fand. Auffallend ist, daß 2 Frauen- trotz
fehlender Metastasen und positiver Lymphknotenreaktion -
innerhalb von 3 Jahren verstarben. Allerdings ließ sich dabei
die Ursache des außerhalb der Klinik eingetretenen Todes bis-
lang nicht ermitteln.

Vergleicht man nun die Häufigkeit des Auftretens von Kohlen-
hydraten in den SR mit den jeweiligen anatomischen Lymph-
knotenreaktionen, dann ergibt sich meist eine Parallelität
zur prognostisch günstigeren histologischen Reaktion der
Sinushistiocytose, der lymphatischen Hyperplasie oder deren
Mischform. Allerdings findet sich die histochemische Reaktion
seltener als die rein histologische. So waren bei den
22 Überlebenden Frauen zwar 17-mal histologische Lymphknoten-
reaktionen, aber nur 12-mal kohlenhydrathaltige Einschlüsse
in den SR feststellbar, bei den 16 verstorbenen Patientinnen
betrug dieses Verhältnis 7:5.

Zur Beurteilung des Zusammenhanges zwischen Lymphknoten-
reaktionen und Metastasenhäufigkeit wurden nun für alle 52 un-
tersuchten Fälle, ohne Rücksicht auf die Überlebensdauer, die
anatomischen und histochemischen Lymphknotenreaktionen
zu der Häufigkeit des Auftretens von Metastasen in Beziehung
gesetzt (Tbl.7).

Insgesamt fanden sich 32-mal Lymphknotenmetastasen im Operati-
onspräparat. Die häufigste histologische Reaktion ist die der
SR allein, ihr folgt die Mischform, weit seltener ist die soli-
täre lymphatische Hyperplasie (Tbl.7).

Von den 32 Fällen mit Metastasen wiesen nur etwas mehr als die
Hälfte (18) eine histologische, 16 eine histochemische Reaktion
auf. Demgegenüber waren bei den 20 Patientinnen ohne Metastasen

Tabelle 7

Anatomische und histochemische Lymphknotenreaktionen in Beziehung
zum Auftreten von Metastasen bei 52 Fällen radikal-
operierter Mamma-Carcinome

Metastasen	Anatomische Reaktion	PAS-positive Substanzen
+ (32)	SR allein 12	positiv 9 negativ 3
	lymphatisch allein 1	positiv 0 negativ 1
	Mischform 5	positiv 5 negativ 0
	keine Reaktion 14	positiv 2 negativ 12
	=====	
	Anatomische Reakt.: 18 dabei histochem.positiv:16	
	=====	
0 (20)	SR allein 7	positiv 5 negativ 2
	lymphatisch allein 1	positiv 0 negativ 1
	Mischform 11	positiv 8 negativ 3
	keine Reaktion 1	positiv 0 negativ 1
	=====	
	Anatomische Reakt.: 19 dabei histochem.positiv:13	
	=====	

histologische Reaktion (19-mal) und histochemische (13-mal) weit häufiger.

Es zeigt sich daher wie für die Überlebensdauer auch am Beispiel des Auftretens von Metastasen, daß fehlende Reaktion der regionären Lymphknoten die schlechtere Prognose bedeutet. Daß die histologische Reaktion der Lymphknoten mit Einschränkungen Hinweise auf die Prognose des Tumorgeschehens gibt, ist aus einigen Untersuchungen im Schrifttum bereits bekannt. Wir haben dabei meist nicht berücksichtigte, mögliche Sekundärreaktionen (nach vorausgegangener Probeexzision) durch einzeitiges Operieren ausgeschlossen und gelangten dann zu den gleichen Ergebnissen. Darüber hinaus ließ sich zeigen, daß die histologischen Reaktionen meist mit dem Auftreten von Glykoproteiden in den SR parallel gehen. Es ließ sich zeigen, daß diese keine abgelagerten Kohlenhydrate vom Tumorparenchym oder -stroma darstellen. Die Entstehung der Eiweiß- und Kohlenhydratkomponente in der Retothelzelle im Sinne von Antikörpern ist nach den Untersuchungen von TEILUM unwahrscheinlich. Am ehesten darf man annehmen, daß das Kohlenhydrat in der Retothelzelle selbst gebildet wird, um antransportiertes und resorbiertes Tumoreiweiß als Glykoproteid abzubinden.

Ihr Auftreten, besonders in Verbindung mit den histologischen Lymphknotenreaktionen, kann als weiterer Hinweis auf eine günstigere Prognose des Mamma-Carcinoms angesehen werden. Ihr Fehlen spricht mit weitgehender Sicherheit für eine ungünstige Prognose, ihr Vorliegen kann als bedingt, aber nicht absolut günstig gelten.

Das ist kaum anders zu erwarten, da unsere Untersuchungen nicht die Art des Primärtumors und die seines Stromas in die prognostische Aussage einbeziehen, sondern nur die Lymphknotenreaktion als Zeichen der Abwehrbereitschaft des Organismus gegen eine Überschwemmung mit Tumorzerfallsprodukten betrachten.

Obwohl dabei unseres Erachtens keine speziell gegen das Tumorstadium gerichteten Substanzen gebildet werden, ergibt sich daraus mit Recht die bereits von LEIDENIUS angeschnittene Frage, ob die bei gynäkologischen Radikaloperationen häufig geforderte, obligate Entfernung der regionären Lymphknoten sinnvoll ist. Dies umso mehr als die Möglichkeit besteht, daß die oft in den Lymphknoten anzutreffenden Mastzellen tatsächlich das Tumorstadium hemmende Substanzen enthalten. LENNERT hält es sogar für möglich, daß ihnen gegenüber der Proliferation der SR- die größere prognostische Bedeutung zukommen könnte.

Es wird daher im Folgenden das Auftreten dieser Zellen in den Lymphknoten untersucht und zu deren übrigen Reaktionen in Beziehung gesetzt.

IV. Das Auftreten von Mastzellen im Lymphknoten in Beziehung zu Überlebensdauer und Metastasierung

Die Bedeutung der Mastzellhyperplasie im lymphatischen Abflußgebiet von Carcinomen ist noch umstritten. Die Zahl der Mastzellen nimmt nach Teerpinselung vor dem Auftreten von Hautcarcinomen stark zu und ist bei tumorresistenten Stämmen besonders groß.

FROMME und andere Autoren glauben, daß die Mastzellen toxische Tumorsubstanzen zu paralysieren vermögen. Größere Wahrscheinlichkeit haben die von ASBOE-HANSEN zusammengestellten moderneren Ansichten, nach denen ihre aus sauren Mucopolysacchariden (Heparin) bestehenden Granula als Hyaluronidase-Inhibitoren der Ausbreitung des Tumors entgegenwirken oder- wie KEIL meint- als Hyaluronidasesubstrat das Tumorstadium hemmen. Bemerkenswert ist eine erst kürz-

Tabelle 8

Mastzellhäufigkeit in den Lymphknoten von 38 Patientinnen
mit mindestens 3-jähriger postoperativer Beob-
achtungszeit

	Mastzellen vorhanden	Mastzellen fehlen
38 Fälle	25	13
davon leben	17	5
davon verstarben	8	8

Tabelle 9

Häufigkeit von Metastasen und Mastzellen in den Lymph-
knoten von 52 Mamma-radikaloperierten Patientinnen

Metastasen	Mastzellen vorhanden	Mastzellen fehlen
+ (32)	18	14
Ø (20)	19	1
	37	15

lich erfolgte Mitteilung von LANDSBERGER, daß Heparinoide die Membran von Tumorzellen für cytostatische Substanzen, wie Trenimon, durchlässig werden lassen, normale Zellen aber nicht beeinflussen.

Wir untersuchten die Lymphknoten von 52 wegen Mamma-Carcinom operierter Patientinnen hinsichtlich des Auftretens von Mastzellen. Zur Darstellung der Mastzellen haben wir die Toluidinblau-Metachromasie ihrer Heparin granula benützt. Bei gleicher Vergrößerung wurden in zahlreichen Blickfeldern des Präparates die Mastzellen ausgezählt. Sofern vorhanden, treten sie vorwiegend in den Sinus, seltener in der Pulpa auf.

Wir haben zuerst das Auftreten von Mastzellen (mehr als 1-2 pro Gesichtsfeld) in Beziehung zur Überlebensdauer der 38 mindestens 3 Jahre nach der Operation beobachteten Patientinnen gesetzt (Tbl.8).

Von den 25 Frauen, in deren Lymphknoten sich reichlich Mastzellen fanden, leben 17, also etwa zwei Drittel. Von den verbleibenden 13 Frauen ohne Mastzellen leben dagegen nur noch 5 - also reichlich ein Drittel. Trotz der noch geringen Zahl der Fälle ist es auffällig, daß beim Auftreten von Mastzellen in den Lymphknoten der gleiche Prozentsatz von Frauen überlebt (zwei Drittel), der bei ihrem Fehlen verstarb.

Daneben wurde (Tbl. 9) das Auftreten von Mastzellen mit der Metastasenhäufigkeit aller 52 Fälle verglichen. Dabei zeigt sich, daß das Fehlen von Mastzellen (15-mal) fast immer mit dem Auftreten von Metastasen in den Lymphknoten (14-mal) verbunden ist. Umgekehrt bedeutet ihr Vorhandensein (37-mal) aber keinen sicheren Schutz vor Metastasen, die sich auch dann in fast der Hälfte der Fälle (18-mal) fanden. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit ähnlichen Untersuchungen von LENNERT überein, der bei Mastocytose der Lymphknoten meist keine Metastasen beobachtet hatte.

Tabelle 10

Beziehungen zwischen Lymphknotenreaktionen, Mastzellen und Metastasen bei lebenden und verstorbenen (38) Patienten nach mindestens

2 Jahren Beobachtungsdauer

Längsspalten	V E R S T O R B E N 16			Ü B E R L E B E N D 22	
	1	2	3	4	
	Mit Mastzellen (in Klammern gleichzeitige Metastasen)	ohne Mastzellen (in Klammern gleichzeitige Metastasen)	Mit Mastzellen (in Klammern gleichzeitige Metastasen)	ohne Mastzellen (in Klammern gleichzeitige Metastasen)	
Davon Anzahl →	8 (6)	8 (8)	17 (8)	5 (4)	
ohne jede Lymphknotenreaktion	1 (1)	8 (8)	4 (3)	1 (1)	
mit ausschließlicher histologischer Reaktion	2 (1)	ø (ø)	5 (1)	2 (1)	
mit ausschließlicher histochemischer Reaktion	ø (ø)	ø (ø)	ø (ø)	ø (ø)	
mit histologischer und histochemischer Reaktion	5 (4)	ø (ø)	8 (4)	2 (2)	

Vergleicht man nun das Auftreten von Mastzellen mit den übrigen Lymphknotenreaktionen (Tbl. 10) und setzt es in Beziehung zu Überlebensdauer und Auftreten von Metastasen, dann fällt auf, daß bei der Hälfte der 16 verstorbenen **Frauen das Fehlen von Mastzellen in den Lymphknoten** auch dem Fehlen jeder weiteren Lymphknotenreaktion entspricht (Tbl. 10 , Längsspalte 2). Fehlten dagegen bei den überlebenden Frauen Mastzellen (5-mal), dann war zumindest in 4 Fällen (Tbl. 10, Längsspalte 4) eine histologische (2-mal) oder histologisch-histochemische Lymphknotenreaktion vorhanden. Dem Fehlen von Mastzellen und jeglicher weiteren Lymphknotenreaktion in einem Fall (ebenfalls Längsspalte 4) dürfte nach unserer Überzeugung- trotz bislang dreijährigen Überlebens- eine absolut ungünstige Prognose zukommen; jedoch sind auch die übrigen Fälle dieser Spalte nur als bedingt*günstig anzusehen, insbesondere wenn Metastasen vorhanden sind. Parallelen zu diesen Fällen in der Rubrik der Verstorbenen (Längsspalte 2) fehlen allerdings.

Vergleicht man nun die Längsspalten 1 und 3, dann zeigt sich, wie auch aus Tbl. 8 zu entnehmen, daß bei den überlebenden Frauen in weit höherem Maße (ca. 80%) Mastzellen in den Lymphknoten gefunden werden als bei den verstorbenen, (50%).

Etwa umgekehrt verhält sich die Häufigkeit der Metastasen, **was nach Tbl.9 zu erwarten war. das auffälligste Ergebnis** dieses Vergleiches ist jedoch darin zu sehen, daß in einem Teil der Fälle (Längsspalte 1) trotz des einzelnen oder gemeinsamen Nachweises der verschiedenen Lymphknotenreaktionen (**Mastzellen), histologische und histochemische** Reaktion) Metastasen auftraten und der weitere Verlauf ungünstig war.

Daher sollten diese Reaktionen in den Lymphknoten der bislang überlebenden Frauen (Spalte 3 und 4) nur mit großer Vorsicht für eine günstige Prognose herangezogen werden- am ehesten noch dann, wenn sie gemeinsam beim Fehlen von

Metastasen auftreten. Zumindest für jene Fälle fehlender Lymphknotenreaktionen ist mit dem Ergebnis der 5-Jahresheilung eine weitere Verschlechterung der Statistik zu erwarten.

Aus dieser Zusammenstellung läßt sich schlußfolgern: mit der Einschränkung, daß Größe, Sitz und histologische Eigenart des Primärtumors nicht beurteilt wurden, kann man aus dem Auftreten bestimmter histologischer und histochemischer Reaktionen und dem Nachweis von Mastzellen in den regionären Lymphknoten von Mamma-Carcinomen prognostische Schlüsse ziehen. Entgegen den bisher im Schrifttum vertretenen Ansichten ist jedoch nur eine sichere negative Aussage im Sinne einer absolut ungünstigen Prognose möglich, wenn alle diese Reaktionen fehlen und zudem gleichzeitig Tumormetastasen vorhanden sind. Umgekehrt ist eine günstige Prognose nur bedingt gestattet, dann, wenn Metastasen fehlen und eines oder mehrere dieser Zeichen nachgewiesen werden können. Ob dabei sogar graduelle Abstufungen je nach deren Zahl möglich sind, wird sich wohl erst an einem größeren Material und bei Beurteilung der 5-Jahresheilung entscheiden lassen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die regionären Lymphknoten von 52 wegen Mamma-Carcinom **radikaloperierten Frauen wurden histologisch und histochemisch** mit der Fragestellung untersucht, ob ihre Reaktionen die im Schrifttum zuweilen behaupteten Rückschlüsse auf die Prognose des Tumorgeschehens zulassen und evtl. durch weitere Kriterien zu ergänzen sind.

Störende Sekundärreaktionen der Lymphknoten lassen sich durch Sicherung der Carcinom-Diagnose mittels Schnellschnitt unmittelbar vor der Radikaloperation vermeiden. Anlaß zu den Untersuchungen gab die erstmalige Beobachtung kohlenhydrathaltiger Einschlüsse in den SR der Lymphknoten bei Mamma-Carcinom. Histochemisch lassen sie sich als Glykoproteide charakterisieren, sind weder Ablagerungen von Kohlenhydraten aus dem Tumorparenchym noch aus dessen Stroma, sondern Produkte der SR selbst. Obwohl histochemisch des Russelschen Körperchen sehr ähnlich, werden sie nicht wie diese als Immunkörper gedeutet, sondern als Reaktionsprodukt der Retothelzellen auf die Phagocytose von Tumoreiweiß angesehen. Der Vorgang kann im Sinne der Bindung von Eiweißkörpern durch zelleigene Kohlenhydrate aufgefaßt werden und ist entsprechenden Zellreaktionen bei der Hämosiderinbildung ähnlich.

Die Häufigkeit des Vorkommens dieser Glykoproteide wurde mit der Zahl der Mastzellen und dem Auftreten der anatomischen Lymphknotenreaktionen (Sinushistiocytose und/oder lymphatische Hyperplasie) verglichen. Die meist parallelen Reaktionen werden allein und gemeinsam zur Metastasenhäufigkeit in den Lymphknoten und der Überlebensdauer der Patientinnen nach mindestens dreijähriger Beobachtungszeit in Beziehung gesetzt. Dabei bleibt die Struktur der Primärtumors und die seines Stromas unberücksichtigt.

Treten die Reaktionen einzeln oder in Kombination auf, so nimmt die Häufigkeit der Metastasen ab, die Überlebensdauer zu. Alle Kriterien lassen sich jedoch nicht für eine absolut günstige prognostische Aussage verwerten. Sie schließen einen späteren ungünstigen Verlauf nicht aus, obwohl sie ihn seltener machen und können daher nur bedingt als prognostisch günstige Zeichen angesehen werden. Umgekehrt ist aber eine absolut ungünstige Prognose beim Fehlen aller Reaktionen durchaus möglich.

Die Lymphknotenreaktionen werden als Ausdruck der allgemeinen Abwehrbereitschaft des Wirtsorganismus gegen den Tumor und dessen Eiweißzerfallsprodukte angesehen. Die Bildung immunbiologischer gegen das Tumorstadium selbst gerichteter Substanzen läßt sich dagegen nicht beweisen. Diese Überlegungen machen den Sinn einer systematischen Ausräumung auch der gesunden regionären Lymphknoten bei Radikaloperationen zumindest fraglich.

L I T E R A T U R

=====

- ALBANESE, A.: Über die lokale lymphatische Reaktion beim Gebärmutterkrebs. Zbl.Gynäk. 1930, 2574-2584
- ASBOE-HANSEN, G.: The mast cell. Int. Rev. Cytol. 3, 399-435 (1954)
- BAUMECKER, H.: Carcinom und Lymphknotenmetastasen. Dtsch.Z. Chir. 221, 12-27 (1929)
- BERG, J.W.: Sinus histiocytosis; A fallacious measure of host resistance to cancer. Cancer (Philad.) 9, 935-939 (1956)
- BLACK, M.M., KERPE, St. and F.SPEER: Lymph node structure in patients with cancer of breast. Amer.J.Path. 29, 505-521 (1953)
- BLACK, M.M., OPLER, St.R. and F.SPEER: Survival in breast cancer cases in relation to the structure of primary tumor and regional lymph nodes. Surg. etc. 100, 543-551 (1955)
- BLACK, M.M., SPEER, F. and St.R.OPLER: Structural representation of tumor host relationship in mammary cancer. Amer.J.clin.Path. 26/3, 250-265 (1956)
- BLACK, M.M. and F.SPEER: Lymph node reactivity in cancer patients. Surg.Gynec.Obst. 110, 477-487 (1960)
- DANIELLI, J.F.: A study of techniques for the cytochemical demonstration of nucleic acids and some components of protein. Symp. Soc. exp.Biol. 1, 101 (1947)
- DEMPSEY, E.W., SINGER, M. and G.B. WISLOCKI: Stain.technol. 25 73 (1950)
- DENOIX, P. et C. HEROVICI: Relation entre un aspect histologique particulier: la "cloture" et l'existence ou non d'un envahissement des ganglions pelviens. Etude de 100 cas de cancers du col utérin stade I. Mém.Acad. Chir. 88, 590-593 (1962)
- EHRICH, W.E.: Die zellulären Bildungsstätten der Antikörper. Klin.Wschr. 1955, 315-322
- Die Entzündung. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd.VII/1, S. 1-324. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956
- FABER, M.: The serum glucosamine with particular regard to its significance in connection with origin of amyloid deposits Acta med. Scandinav., 1948, Suppl.206, pp. 351-356
- FAGRAEUS, A.: Zelluläre Aspekte der Antikörperbildung. Vortrag Frankf.Med.Ges.vom 4.5.1955
- Cellular reaction in antibody formation. Acta haemat. (Basel) 20, 1-8 (1958)

- FIORE-DONATI, L. e A.TALLARIGO: Morfologia e significato della reazione linfonodale alla invasione neoplastica. *Giorn.Chin.med.* 34, 35-75 (1953)
- FLEMMING, W.: Studien über Regeneration der Gewebe. *Arch. mikr.Anat.* 24, 50-91 (1885)
- FROMME: Verhalten der Lymphdrüsen beim Carcinoma cervicis uteri; Versuche zur Übertragung des Uteruscarcinoms auf Ratten. *Z. Krebsforsch.* 5, 36-39 (1907)
- GEDIGK, P.: Zur Histochemie des Zentralapparates der Zelle, *Virchows Arch. path. Anat.* 325, 366-378 (1954)
- Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten. *Klin. Wschr.* 1952, 1057-1065
- und G.STRAUSS: Zur Histochemie des Hämosiderins. *Virchows Arch.path.Anat.* 324, 373-390 (1953)
- GNIRS, L.: Die Proliferation der sogenannten Sinusendothelien in den regionären Lymphknoten bei Mastopathia chronica cystica und Mammacarcinom. *Z. Krebsforsch.* 60, 94-114 (1954)
- GOMORI, G.: Aldehyde-fuchsin: A new stain for elastic tissue. *Amer. J. clin. Path.* 20, 665-666 (1950)
- GRESHAM, G.A. and A.G. ACKERLEY: Gigant cell granulomata in regional lymph nodes of carcinoma. *J.clin. Path.* 11, 244-250 (1958)
- GRUNDNER-CULEMANN, A. und P.B. DIEZEL: Histochemische Untersuchungen an Russelschen Körperchen im Granulationsgewebe plasmacellulärer Entzündungen und in Geschwulstzellen. *Frankf. Z. Path.* 66, 161-180 (1955)
- HELLMANN, T.J.: Studien über das lymphoide Gewebe. Die Bedeutung der Sekundärfollikel. *Beitr. path.Anat.* 68, 333-363 (1921)
- JUSTIN-BESANÇON, L., RUBENS-DUVAL, A., VILLIAMEY, J. et M.CAROIT: Étude histochemique des adénopathies de la polyarthrite chronique évolutive. *Rev.Rhum.* 22, 10-15 (1955)
- KEIL, E.: Gerinnungsfaktoren und Krebs. *Strahlentherapie* 93, 223-235 (1954)
- KRAMER, H. and G.M. WINDRUM: The metachromatic staining reaction. *J. Histochem.Cytochem.* 3, 227-237 (1955)
- LANDSBERGER, A.: Selektive Einschleusung von Evans-blue in Tumorzellen durch Heparinoid. *Klin.Wschr.* 11, 566 (1963)
- LAVES, W.: Histochemische Beiträge zum Glykoproteid-Problem. *Verh. Dtsch. Ges.Pathol.* 1948, 8. 134-138
- LEIDENIUS, L.: Über die regionären Lymphdrüsen bei Uteruscarcinom. *Acta obstetr. scand.* (Stockh.) 10, 32-62 (1930)

- LENNERT, K.: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie I/3 Lymphknoten Bd.A, Springer-Verlag (1961)
- Über die Erkennung von Keimzentrumszellen im Lymphknoten-ausstrich. Klin.Wschr, 1957 b, 1130-1132
 - und E.ILLERT: Die Häufigkeit der Gewebsmastzellen im Lymphknoten bei verschiedenen Erkrankungen. Frankf. Z. Path. 70, 121-131 (1959)
 - ,LENNERT, Kurt und J.C.F. SCHUBERT: zur Histochemie der Gewebsmastzellen im menschlichen Lymphknoten. Frankf.Z. Path. 69, 591-595 (1959)
 - Über den Ort der Antikörperbildung. Antrittsvorlesung Frankfurt, 6.11.1952 b, nicht veröffentlicht.
- LILLIE, R.D. and J.GRECO: Malt diastase and ptyalin in place of saliva in the identification of glykogen. Stain. Technol. 22,67 (1947)
- Ethylenic reaction of ceroid with performic acid and Schiff reagent. Stain Technol. 27,37 (1952)
- LIPP, W.: Histochemische Methoden. München 1954
- LISON, L.: Alcian blue 8 G with chlorantine fast red 5 B. A technic for selective staining of mucopolysaccharides. Stain. Technol. 29, 131-138 (1954)
- Histochimie et cytochimie animales. Paris: Gauthier Villars 1953
- McMANUS, J.F.A.: Histological demonstration of mucin after periodic acid. Nature (Lond.) 158, 202 (1946)
- MEYER, K.: The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. Physiol. Rev. 27, 335-359 (1947)
- MEYER-ARENDT, J.: Über den Zellstoffwechsel in der Milz nach Sensibilisierung. Virchows Arch. path.Anat. 321, 378-384 (1952)
- MOESCHLIN, S, PELAEZ, J.R. and F.HUGENTOBLE: Experimental investigations of the relationship between plasma cells and antibody formation (phase contrast microscope). Acta haemat. (Basel) 6, 321-334 (1951)
- , --, --, BÂGUENA, R. BÂGUENA, J. and B. DEMIRAL: Experimental investigations of the relationship between plasma cells and antibody formation (phase contrast microscope, ACTH and cortisone). I. Internat. Allergie-Kongr., Zürich 1951, S. 239-248
- PEARSE. A.G.E.: Histochemistry tehoretical and applied. London: J.A. Churchill 1953
- The nature of Russel bodies and Kurloff bodies. Observations on the histochemistry of plasma cells and reticulum cells. J.Clin.Path.2, 81 (1949)

- PIRANI, C.L.: The pathogenesis of amyloidosis. *Lancet*, 1951, 2 166
- PISCHINGER, A.: Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Grundlage ihrer verschiedenen Färbbarkeit. *Z. Zellforsch.* 3, 169 (1926)
- ROMMEIS, B.: *Mikroskopische Technik*, 15. Aufl. München 1948
- SCOTT, H.R. and B.P. CLAYTON: A comparison of the staining affinities of aldehyde-fuchsin and the Schiff reagent. *J. Histochem. Cytochem.* 1, 336-352 (1953)
- SPIGOLON, G.: Ricerche istopatologiche sulle linfoghiandole regionali nelle neoplasie epiteliali maligne. *Arch. iat. Anat. e Istol. pat.* 25, 163-177 (1952)
- STEEDMAN, H.F.: Alcian blue 8 Gs. A new stain for mucin. *Quart. J. micr. Sci.* 91, 477-479 (1950)
- STRAUSS, G.: Unveröffentlichte Untersuchung, 1956
- Zur Kohlenhydrathistochemie des Endometriums. Sitzungsber. Mittelrhein. Ges. für Geburtshilfe und Gynäkologie vom 22./23.4.1961, Ref. Zbl. Gynäk. 84, 20, 813 (1962)
 - Zur Funktionsdiagnostik des Endometriums mit Aldehydfuchsin. Tagungsber. 60. Tagg. Nordwestdt. Ges. für Gynäkologie und Geburtshilfe vom 21./22.10.1961, Kiel. Ref. Geburtsh. u. Frauenheilk. 22, 467 (1962)
 - Histochemische Untersuchungen bei Pagetscher Erkrankung der Vulva. *Z. Krebsforsch.* 61, 632-648 (1957)
 - Zur Histochemie der Kohlenhydrate in den Endometriumdrüsen des Menschen. *Arch. Gynäk.* 197, 524-547 (1962)
- TEILUM, G.: Periodic acid-Schiff-positive reticulo-endothelial cells producing glycoprotein. Functional significance during formation of amyloid. *Amer. J. Path.* 32, 945-959 (1956)
- WARTMANN, W.B.: Sinuscell hyperplasia of lymph nodes regional to adenocarcinoma of breast and colon. *Brit. J. Cancer* 13, 389-397 (1959)
- WUKETICH, St.: Über die epitheloidzelligen, tuberkuloiden Reaktionen in Lymphknoten bei malignen Geschwülsten. *Frankf. Z. Path.* 70, 187-200 (1959)

==== Lebenslauf =====

Am 26.10.1933 wurde ich, Maria, Elisabeth Egermburg, Tochter des Elektroingenieurs Georg Flegel und dessen Ehefrau Ruth geb. Lüneburg als erstes von fünf Kindern in Breslau geboren. Vom 1.4.1940-1.9.1943 besuchte ich die Grundschule in Breslau und zwischenzeitlich die in Weiz/Steiermark und übersprang ein Schuljahr.

Ab 1.9.1943 war ich Schülerin der König-Wilhelm-Oberschule in Breslau und durch Evakuierung der Augusta-Oberschule und später des Gymnasiums in Strehlen.

Am 21.1.1945 wurden wir aus unserer Heimat vertrieben und kamen nach Leipzig, wo ich die Max-Klinger-Schule bis 1.9.1951 besuchte und am 11.6.1951 die Reifeprüfung mit "gut" bestand.

Da ich aus politischen und sogenannten gesellschaftlichen Gründen nicht zum Studium zugelassen wurde, begann ich ab 1.10.1951 die Hebammenausbildung in Magdeburg und bestand am 22.1.1953 das Examen mit "Sehr gut".

Bis zum Medizinstudium ab 1.9.1953 in Halle, das durch die Auswirkungen des 17. Juni möglich wurde, arbeitete ich als Hebamme im Kreiskrankenhaus Zwenkau b. Leipzig.

Im Sommer 1954 bestand ich das Vorphysikum und war bis Oktober 1955 Studentin der medizinischen Fakultät.

Am 12.4.1955 schloß ich mit dem Elektroingenieur und stud. ing. Georg Grzempa die Ehe, wurde am 25.7.1958 schuldlos geschieden, nahm am 12.7.1961 wieder meinen Mädchenamen an, der am 9.3.1962 in Egermburg geändert wurde.

Aus gesundheitlichen Gründen war ich gezwungen im Studienjahr 1955/56 auszusetzen. In der Zeit unterrichtete ich an der August-Herman-Francke-Oberschule in Halle vertretungsweise Biologie.

Auf ärztliches Anraten änderte ich mein Berufsziel und wurde ab September 1956 Studentin der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät, mit dem Ziel, Oberschullehrerin für Biologie und Chemie zu werden.

Mir wurde mein bisheriges Studium angerechnet und ich holte Vorlesungen und Praktika nach.

Während des Examens im Herbst 1958 ergab sich eine derartige Zwangslage, daß ich ganz plötzlich die SBZ verlassen mußte. Im November 1958 kam ich nach Mainz und begann mit der Promotion in Biologie. Da ich aber sah, daß ich mit Biologie allein in den mich interessierenden theoretischen Fächern der medizinischen Fakultät kaum eine Arbeitsmöglichkeit finden würde, nahm ich das Medizinstudium wieder auf. Im Herbst 1960 bestand ich das Physikum und widme mich seitdem dem klinischen Studium und mit besonderer Neigung den theoretischen Richtungen.

Mainz, den 15.7.1963

Marie E. G. J. J.

